

PROBIOTSKI STATUS BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Kratak sadržaj

Probiotici se definišu kao živi mikroorganizmi koji, kada se unesu, pokazuju blagotvoran efekat na domaćina. Mnogi sojevi iz roda *Lactobacillus* imaju status probiotika. Nedostatak gena za prenošenje rezistencije na antibiotike jedan je od ključnih uslova kako bi soj dobio GRAS status. Svaki probiotički soj bi trebalo da preživi pasažu kroz gastrointestinalni trakt, kako bi uspeo da ostvari blagotvorne efekte po domaćina.

Materijal za ovo ispitivanje predstavljao je 51 soj laktobacila koji su izolovani iz sjeničkog sira.

Svi sojevi su ispitivani na rezistenciju na devet antibiotika. Od ukupno 51 soja, šest je pokazalo osetljivost na sve antibiotike, dok je 23 pokazalo prirodnu rezistenciju, koja, kao takva, nije rizična za prenošenje gena. Najčešći profil rezistencije bila je rezistencija na vankomicin i tetraciklin. Od 18 sojeva koji su stekli uslove za dalje ispitivanje, kod devet njih je ispitivana mogućnost preživljavanja u simuliranim uslovima želuca, odnosno duodenuma. Takođe je ispitivana i antimikrobna aktivnost i sposobnost hemolize. Svih devet sojeva je pokazalo odličnu sposobnost preživljavanja u simuliranim uslovima želuca, dok je svega tri moglo da preživi u prisustvu žučnih soli. Svih devet sojeva je pokazalo antimikrobnu aktivnost protiv *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, a nijedan nije pokazao hemolizu.

Prema rezultatima u ovom ispitivanju, sojevi laktobacila izolovani iz sjeničkog sira pokazali su da imaju potencijal da steknu status probiotika, ali su za to potrebna dalja ispitivanja.

Ključne reči: probiotik, laktobacili, kriterijumi selekcije.

¹ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18.

UDK 616-78:547.472.3

T. Ledina, Z. Mijačević, S. Bulajić, M. Babić²

STATUS OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Abstract

Probiotics are live microorganisms that exhibit a beneficial effect on the health of the host when ingested. Many strains of lactic acid bacteria from *Lactobacillus* genus are recognized as probiotics. Absence of transferable genes for antibiotic resistance is crucial so that probiotic strain can acquire GRAS status. Also every probiotic should survive conditions in digestive tract.

Material for this research was 51 strain of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional cheese from Sjenica.

All strains were analyzed for resistance to 9 different antibiotics – 6 of them showed susceptibility to all antibiotics, while 23 showed profile of intrinsic antibiotic resistance. Most common resistance profile was resistance to vancomycin and tetracycline. For further research, 9 strains were chosen, and they were analyzed for viability in simulated gastric and duodenal conditions, antimicrobial activity and hemolysis. All strains showed excellent survival in simulated gastric conditions, while only 3 of them could survive in presence of bile salts. All 9 strains showed antimicrobial activity toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*; none of them showed hemolysis on agar.

According to these results, strains of lactobacilli from Sjenica cheese have potential for becoming probiotics, but it requires further research.

Key words: probiotic, lactobacilli, selection criteria.

² Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18.

UVOD

Koncept funkcionalne hrane poznat je još iz doba Hipokrata, koji je tvrdio da „hrana treba da bude lek“ (Vasiljević i Shah, 2008). Funkcionalna hrana je ona hrana koja, pored adekvatnih nutritivnih efekata, ima povoljne efekte na ciljne funkcije u organizmu značajne sa aspekta poboljšanja zdravlja i blagostanja, i/ili za smanjenje rizika od bolesti.

U konceptu funkcionalne hrane, naročito u industriji proizvoda od mleka, raste interesovanje za probiotske proizvode koji sadrže bakterije mlečne kiseline koje vode poreklo iz gastrointestinalnog trakta. Probiotici se mogu definisati kao živi mikroorganizmi koji imaju blagotvoran efekat na zdravlje domaćina kada se unesu u organizam u adekvatnoj količini, a poseban značaj među njima imaju sojevi *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. (World Gastroenterology Organization – WGO, 2009). Važna osobina probiotika je zaštita od patogenih mikroorganizama u digestivnom traktu domaćina, što se postiže zahvaljujući produkciji antimikrobnih komponenti. Njihova uloga u borbi protiv crevnih infekcija je potvrđena i do-

kumentovana u mnogim istraživanjima (Kos i sar., 2008; Frece i sar., 2009; Saulnier i sar., 2009).

Postoji veliki broj vrsta i sojeva bakterija mlečne kiseline, ali ne mogu se sve one nazvati probioticima. Brojni su kriterijumi prema kojima se vrši selekcija probiotskih kultura, ali postoje tri osnovna bez kojih ne može da se pristupi nijednom narednom koraku u selekciji. Da bi mikroorganizam bio kandidat za probiotik, osnovni uslovi su:

1. da bude normalni stanovnik gastrointestinalnog trakta,
2. da ne bude patogen,
3. da je sposoban da kolonizuje creva u visokim koncentracijama 10^7 – 10^9 CFU/ml (Mattila-Sandholm i sar., 2002; FAO/WHO, 2002).

Dalji kriterijumi na osnovu kojih se vrši selekcija probiotika podeljeni su na bezbednosne tehnološke, funkcionalne kriterijume i kriterijume koji se tiču poželjnih fizioloških svojstava. Njihova klasifikacija prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Kriterijumi i svojstva za selekciju probiotika (Shah, 2006; Morelli, 2007)

Kriterijum	Svojstvo koje se ispituje
Bezbednosni	Poreklo
	patogenost i infektivnost
	rezistencija na antibiotike
	faktori virulencije – toksičnost, metabolička aktivnost
Tehnološki	genetička stabilnost soja
	vijabilnost tokom proizvodnje i čuvanja
	dobra senzorna svojstva

Funkcionalni	rezistencija na bakteriofage
	proizvodnja u velikim količinama
	tolerancija na kiselu sredinu u želucu
	tolerancija na prisustvo žučnih soli
	adhezija na površinu mukoze
Poželjna fiziološka svojstva	potvrđeni i dokumentovani efekti na zdravlje
	imunomodulacija
	antagonistička aktivnost protiv gastrointestinalnih patogena
	uticaj na metabolizam holesterola
	uticaj na metabolizam laktoze
	antimutagena i antikancerogena svojstva

Brojni naučni radovi naglašavaju značaj pažljive selekcije mogućih probiotičkih sojeva bakterija mlečne kiseline. Kriterijumi selekcije su postavljeni, pre svega, u odnosu na bezbednost probiotika, ali ništa manje važni nisu ni tehnološki, odnosno funkcionalni zahtevi.

Cilj ovog rada jeste karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila u odnosu na njihov probiotski status. Svi sojevi su izolovani iz tradicionalnih sireva poreklom iz okoline Sjenice, koji su pravljeni od sirovog mleka.

MATERIJAL I METODE

Materijal

Materijal za rad u ovom istraživanju predstavljao je 51 soj laktobacila izolovanih iz tradicionalnih sireva od sirovog mleka sa područja Sjenice.

Metode

Test osetljivosti/ rezistencije na antibiotike – disk-difuzioni test (*disc diffusion test*). Osetljivost, odnosno rezistencija izolovanih sojeva laktobacila na antibiotike, ispitivana je pomoću disk-

difuzione metode, s time da su korišćeni BBL diskovi impregnirani odgovarajućim antibiotikom (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton, Dickinson & Company). Testirana je osetljivost na devet različitih antibiotika: ampicilin (10μg), ciprofloksacin (5μg), eritromicin (15μg), gentamicin (120μg), hloramfenikol (30 μg), klindamicin (2μg), penicilin (10 IJ), streptomycin (10μg), tetraciklin (30μg) i vankomicin (3 μg). Nekoliko identičnih kolonija ispitivanog soja laktobacila je resuspendovano u 5 ml BHI (Brain Heart Infusion) bujona (Merck), a standardizacija suspenzije je postignuta poređenjem sa 1 McFarland standardom. Inokulacija ispitivanog soja na površinu MRS agara je izvršena primenom brisa koji se nakon potapanja u pripremljeni inokulum ravnomerno prevlači preko površine podloge. Postavljanje BBL diskova je obavljeno sterilnom pincetom. Ploče su inkubirane na 37°C/24h. Nakon inkubacije, očitane zone inhibicije (mm) interpretirane su prema Vlkova i saradnici (2006), tako da su kategoriju osetljive populacije predstavljali svi sojevi laktobacila sa zo-

nom inhibicije ≥ 21 mm, dok su sojevi sa zonom inhibicije ≤ 15 mm svrstani u rezistentnu populaciju laktobacila.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja u simuliranim uslovima želudačne sredine – gastro test

Za simulaciju uslova u želudačnoj sredini, korišćena je metoda „gastro test”. Napravljen je rastvor u sastavu 0,5% NaCl i 0,22% pepsina, a pH vrednost je bila podešena na 2 sa 1M HCl. Prekonoćne kulture su inokulisane u ovaj rastvor u odnosu 1:10, a zatim su stavljane na inkubaciju od 1h na temperaturi od 37°C (Radulović i sar., 2008). Po inokulisanju kulture ispitivanog soja laktobacila, kao i nakon inkubacije u trajanju od 1h, odgovarajuća serijska razblaženja su zasejavana na MRS (Merck) agar, u cilju određivanja početnog broja, kao i broja laktobacila po inkubaciji.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja u simuliranim uslovima u duodenumu – test žučnih soli

Kako bi se imitirali uslovi koji postoje u duodenumu, primenjen je test žučnih soli. Pripremljen je rastvor od rekonstituisanog obranog mleka u prahu, žučnih soli (0,4%) i pankreatina (0,2%). U ovako pripremljen rastvor dodavane su prekonoćne kulture ispitivanih sojeva, a zatim stavljane na inkubaciju od 1h na temperaturi od 37°C (Radulović i sar., 2008). Kao i u prethodnom testu, po inokulisanju kulture

laktobacila u pripremljeni rastvor, kao i nakon inkubacije, odgovarajuća serijska razblaženja su zasejavana na površinu MRS (Merck) agara, u cilju određivanja početnog broja i broja laktobacila sposobnih da prežive inkubaciju u trajanju od jednog časa u simuliranim uslovima duodenuma.

Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ispitivanih sojeva laktobacila određena je u odnosu na *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 i *Staphylococcus aureus* (kolekcija Laboratorije Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla) kako bi se utvrdilo da li postoji inhibitorno dejstvo ispitivanih sojeva na navedene patogene bakterije. Korišćen je *Agar-well diffusion assay*, metod bunarčića u agaru (Tagg i Mc-Given, 1971). Prethodno pripremljen MRS agar koji se nalazio u Petrijevoj ploči prelivan je sa 5ml soft agara u koji je dodato 5 μ l kulture navedenih patogenih bakterija (prethodno inkubiranih 24h u BHI bujonu na 37°C). Na MRS agar prethodno su stavljeni sterilni nastavci za automatske pipete, promera 5mm, kako bi se formirala udubljenja kada se agar stegne. Kada je soft agar bio stegnut, nastavci su uklanjani, tako da na sredini ostane bunarčić u koji je dodavano 50 μ l supernatanta bujonske kulture ispitivanog soja laktobacila dobijenog centrifugovanjem pri 12 000 rpm (*revolution per minute*) tokom 15 minuta. Ploče su potom držane 2h na temperaturi frižidera, a zatim inkubirane 24h na 37°C. Posle tog vre-

menskog perioda, merena je zona inhibicije rasta *L. Monocytogenes* i *S. aureus* oko bunarčića u koji je dodat ispitivani soj laktobacila.

Sposobnost hemolize na krvnom agaru

Hemolitička aktivnost sojeva *Lactobacillus spp.* ispitivana je kako bi se utvrdilo da li postoji mogućnost za patogeno delovanje ispitivanih sojeva. Devet sojeva koji su izabrani na osnovu rezultata prethodnih testova, zasejano je na krvni agar i stavljeno na inkubaciju na 37°C/48h. Nakon toga, očitavani su rezultati. Prisustvo prosvetljenja, odnosno hemolize na krvnom agaru, ukazuje na hemolitičku aktivnost i time moguće patogeno delovanje ispitivanih sojeva.

REZULTATI I DISKUSIJA

Test osetljivosti/ rezistencije na antibiotike kod ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.*

Pitanje rezistencije mikroorganizama na antibiotike postaje sve važnije, jer se prema trenutnim saznanjima hrana smatra najvažnijim vektorom širenja antibiotske rezistencije između ljudi i životinja. Zbog toga je 2001. godine SCAN (Scientific Committee of Animal Nutrition) dobio zahtev da ispita i definiše kriterijume za procenu bezbednosti mikroorganizama koji su rezistentni na antibiotike, a koriste se kao probiotici u hranivima za životinje (EFSA 2008). Kao posledicu stečenih saznanja, SCAN je preporučio komisiji Evropske unije da u hrani za ljude i hranivima za životinje

zabrani upotrebu probiotika koji poseduju gene za rezistenciju na antibiotike, a koji imaju mogućnost transfera na druge mikroorganizme (Danielsen i Wind, 2003).

Bakterije mlečne kiseline mogu da predstavljaju prirodni rezervoar gena rezistencije na antibiotike, a u određenim uslovima oni mogu da se prenesu na patogene mikroorganizme putem lanca hrane, ili u gastrointestinalnom traktu (Bernardeau, 2008). Zbog pojave sve većeg broja patogena koji su rezistentni na antibiotike i zbog mogućnosti prenošenja te rezistencije, jedan od najvažnijih kriterijuma u odabiru potencijalnih probiotskih sojeva bakterija je njihova osetljivost na delovanje antibiotika (Bulajić i Mijačević, 2011).

U ovom radu ispitivana je rezistencija/ osetljivost laktobacila na devet odabranih antibiotika koji imaju poseban značaj u kliničkoj praksi. Korišćeni su antibiotici koji pripadaju različitim klasama: iz klase penicilina, testirana je osetljivost na penicilin i ampicilin; iz klase aminoglikozida gentamicin i streptomycin; od makrolida ispitivana je osetljivost/ rezistencija na eritromicin. Kao predstavnik klase fluorokvinolona uzet je ciprofloksacin, glikopeptidnih antibiotika vankomicin, a linkozamida klindamicin. Ispitivana je osetljivost i na tetraciklin i hloramfenikol. U tabeli 2. prikazani su profili rezistencije ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.*

Tabela 2. Prikaz fenotipske rezistencije ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.* u odnosu na odabrane antibiotike

Rezistencija na	Rezistentni sojevi laktobacila		Zastupljenost sojeva u odnosu na rezistenciju prema antibiotiku/ antibioticima* – profili rezistencije
	broj	%	
1 antibiotik	19	37,25	vankomicin (13), gentamicin (5), tetraciklin (1)
2 antibiotika	21	41,18	vankomicin+ tetraciklin (10), vankomicin+gentamicin (5), gentamicin+tetraciklin (3), penicilin+tetraciklin (1), gentamicin+ penicilin (1), vankomicin+ penicilin (1)
3 antibiotika	4	7,41	penicilin+ vankomicin+tetraciklin (3), gentamicin+tetraciklin+eritromicin (1)
4 antibiotika	1	1,96	gentamicin+penicilin+tetraciklin+eritromicin

Od 51 ispitivanog soja, šest (11,76%) je bilo osetljivo na sve antibiotike, dok je na jedan od njih rezistenciju pokazalo 19 sojeva. Postojanje multirezistencije (rezistencije na dva ili više antibiotika) zapaženo je kod 26, odnosno 50,98% sojeva.

Najveći broj ispitivanih sojeva pokazao je rezistenciju na vankomicin, bilo pojedinačno (13 sojeva), ili u kombinaciji sa još jednim ili više antibiotika (19 sojeva). Laktobacili pokazuju intrinzičnu, prirodnu rezistenciju na određeni broj antibiotika (bacitracin, cefoksitin, kanamicin, norfloksacin i druge), a među njima se nalazi i vankomicin. Ipak, ovaj vid rezistencije nije prenosiv na druge bakterije, tako da rezistencija na vankomicin u ovom radu nije posmatrana kao kriterijum za eliminaciju soja iz daljih ispitivanja, ukoliko je on bio osetljiv na sve druge antibiotike (Danielsen i Wind, 2003). Od antibiotika koji su korišćeni u ovom ispitivanju, laktobacili poseduju prirodnu rezisten-

ciju i na gentamicin (Bernardeau i sar., 2008), pa ni rezistencija na njega nije razmatrana kao uslov za eliminaciju. Izuzetno visok procenat rezistencije na vankomicin je u skladu i sa drugim ispitivanjima koja su vršena (Bulajić i Mijačević, 2011; Coppola i sar., 2005). Prema podacima Bernardeau i sarađnika (2008), striktno homofermentativni laktobacili mogu da pokazuju osetljivost na ovaj antibiotik, a samo u jednom istraživanju je i pokazana osetljivost laktobacila na vankomicin (Murad i Meriem, 2008).

Određeni broj ispitivanih sojeva (16) pokazao je rezistenciju i na gentamicin, a ovakvi rezultati se mogu naći i u literaturnim podacima (Kaktcham i sar., 2011; Bulajić i Mijačević, 2011). Pojedini literaturni podaci ukazuju na daleko veći procenat rezistencije na gentamicin od rezultata u ovom ispitivanju. U istraživanju koje su sprovedi Danielsen i Wind (2003), svi ispitivani sojevi laktobacila su pokazali visoki

nivo rezistencije na aminoglikozidne antibiotike; u istraživanju Coppola i saradnika (2005), na gentamicin je bilo rezistentno čak 98% ispitivanih sojeva. Ovakvi rezultati su u skladu sa podatkom da je i u slučaju gentamicina u pitanju intrinzična rezistencija.

Rezistenciju na tetraciklin pokazalo je 20 sojeva, uglavnom u kombinaciji sa jednim ili više drugih antibiotika, a prema literaturnim podacima radi se o stečenoj rezistenciji (Nawaz i sar., 2011), što predstavlja poseban rizik po zdravlje potrošača, jer ovaj vid rezistencije ima mogućnost transfera između bakterija.

Najveći broj ispitivanih sojeva je bio osetljiv na penicilin i eritromicin. Podaci o rezistenciji na penicilin se dosta razlikuju – postoje oni gde se navodi da su svi ispitivani sojevi laktobacila osetljivi na penicilin (Sieladie i sar., 2011; Danielsen i Wind, 2003; Nawaz i sar., 2011). U nekim istraživanjima je prevalenca rezistencije na penicilin varirala (Salminen i sar., 2006), dok je u pojedinim istraživanjima veliki broj ispitivanih sojeva laktobacila (63,16%) bio rezistentan (Bulajić i Mijačević, 2011).

U rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, samo dva ispitivana soja laktobacila su pokazala rezistenciju na eritromicin, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Nawaz i saradnici (2011), gde su takođe dva ispitivana soja pokazala ovaj vid rezistencije.

Nijedan od ispitivanih sojeva laktobacila nije pokazao rezistenciju na

ampicilin, ciprofloksacin, klindamicin i hloramfenikol, što je u skladu sa literaturnim podacima (Danielsen i Wind, 2003; Coppola i sar., 2005; Nawaz i sar., 2011). Ipak, postoje podaci i o visokom procentu rezistencije na ciprofloksacin kod sojeva laktobacila (Sieladie i sar., 2011).

Osetljivost na sve ispitivane antibiotike bio je preduslov da se sojevi dalje ispituju u drugim testovima (studija preživljavanja, antimikrobna aktivnost u odnosu na odabrane patogene bakterije i potencijal patogenosti usled hemolitičke aktivnosti).

Studija preživljavanja – gastro test

Ispitivanje probiotskih svojstava određenih bakterija podrazumeva da se uvek govori o živim mikroorganizmima (WGO, 2009). Kako bi se ovaj uslov ispunio, neophodno je da probiotske kulture pasiraju gastrointestinalni trakt u određenom broju kao žive ćelije. Prvi celularni stres koji laktobacili pri prolasku kroz gastrointestinalni trakt doživljavaju jesu veoma niske pH vrednosti u želucu, koje se kreću od 1,5 do 3 (Sieladie i sar., 2011). Kako bi se ispitao trend promene brojnosti laktobacila u uslovima simulirane želudačne sredine, sprovedena je studija preživljavanja – gastro test. Od 29 sojeva koji su ispunili uslov za dalje ispitivanje, izabrano je devet za studije preživljavanja, odnosno ispitivanje sposobnosti preživljavanja sojeva laktobacila u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta.

U tabeli 3. prikazano je preživljavanje laktobacila nakon inkubacije od jednog sata u simuliranim uslovima želudačne sredine.

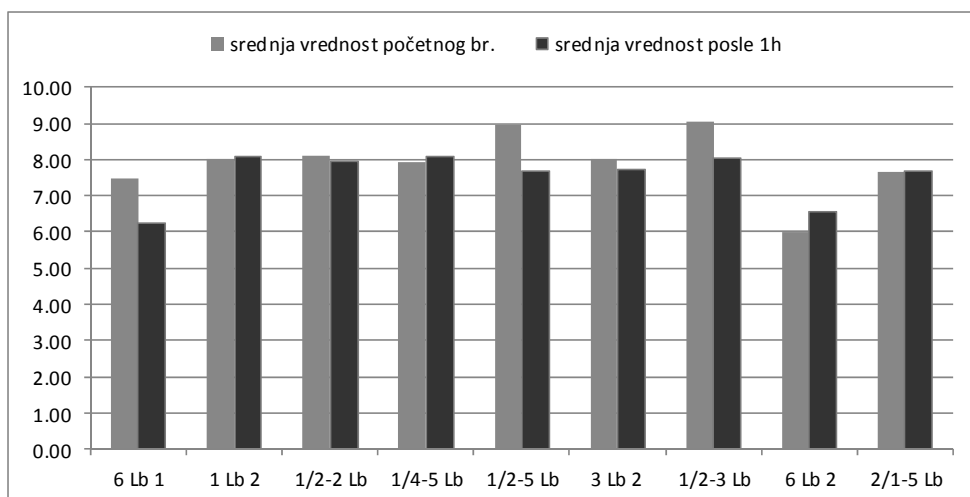
Tabela 3. *Preživljavanje laktobacila posle 1h inkubacije u simuliranim uslovima želudačne sredine*

Preživljavanje laktobacila u simuliranim uslovima želudačne sredine		
Statistički parametar	Početni broj log CFU/ml	Vrednost posle 1h log CFU/ml
Broj sojeva	9	9
Srednja vrednost i standardna devijacija	7,91±0,89	7,57±0,68
Minimalna vrednost	6,00	6,26
Maksimalna vrednost	9,05	8,10
Procenat preživljavanja	96,22	

U rezultatima dobijenim u ovom ispitivanju, procenat preživljavanja je bio 96, 22% posle 1h inkubacije u uslovima koji imitiraju želudačnu sredinu (pH=2, uz prisustvo pepsina).

Na grafikonu 1. prikazana je promena broja log CFU/ml ispitivanih sojeva laktobacila nakon inkubacije od 1h u simuliranim uslovima želudačne sredine.

Grafikon 1. *Promena broja log CFU/ml laktobacila nakon inkubacije od 1h u imitiranim uslovima želudačne sredine*



Sa grafikona 1. može se приметити да је код четири soja број log CFU/ml после једног сата порастао. Иако ни у једном другом истраживању није забележен пораст броја микроорганизама након инкубације у имитираним условима желудачне средине, у литературним подацима се наглашава да је осетљивост на снижену pH вредност и понашање у присуству желудачне киселине и пепсина строго зависно од soja и да може умногосте да варира (Millette и сар., 2008; Maurad и Meriem 2008). Процент преживљавања који износи више од 50% сматра се добрим, а том критеријуму одговарају и сви sojeви испитивани у овом истраживању (Sieladie и сар., 2011). Уколико се упореде резултати добијени у овом испитивању са резултатима из literature, евидентно је да су у свим истраживањима добијени различити подаци. У истраживању које су спровели Maurad и Meriem (2008), од испитиваних 14 sojeва, четири су у довољном броју преживела ниску pH вредност ($pH=2$). У другом истраживању, које је спроведено на четири позната probiotska soja laktobacila, сви тестирани sojeви су преживели 30 минута инкубације са незначителним смањенjem броја при pH вредностима већим од 2, док је значајан пад броја laktobacila установљен тек при pH вредностима мањим од 2 (Millette и сар., 2008). Ови подаци одговарају резултатима које су добили Prasad и сарадници (1998), где ни после 3 сата није забележен пад броја laktobacila при pH вредности 3. Резултати добијени у овом истраживању имају неких подударности

са резултатима које су добили Nawaz и сарадници (2011), где се проценат преживљавања углавном кретао између 80% и 92% после 48 сати инкубације при pH вредности 2,5. Изузетно висок проценат преживљавања је запажен у једном од истраживања, 94,3%–99,56%, и овај резултат је најближи ономе што је добијено у овом gastro тесту (Radulović и сар., 2008).

In vitro испитивања преживљавања laktobacila у симулираним условима желудачне средине ипак не могу да се узму као апсолутни показатељ преживљавања у условима *in vivo*, јер одређене компоненте намирница могу да имају заштитно дејство на бактерије у самом желуцу, а битна је и интеракција са присутном микрофлором у специфичном матриксу намирнице (Sieladie и сар., 2011).

Студија преживљавања – тест жучних соли

Sojeви laktobacila који су се у претходном “gastro” тесту показали као acidotolerantni, испитани су у односу на способност njihovog преживљавања у симулираним условима duodenuma (раствор са 0,4% жучних соли и 0,2% панкреатина). Физиолошке концентрације жучних соли у duodenumu човека износе 0,1%–0,3% (Dunne и сар., 2001), односно 0,5% (Mathara и сар., 2008). Због тога је неопходно да ефикасни probiotski sojeви имају способност раста при концентрацији жући 0,15%–0,3% (Šušković и сар., 2001). Способност преживљавања у присуству 0,4% жучних соли које је при-

menjeno u ovom ispitivanju veoma je dobar pokazatelj potencijala preživljavanja ispitivanih sojeva laktobacila i u *in vivo* uslovima, gde su koncentracije žuči niže.

U tabeli 4. prikazane su početne vrednosti, zatim promena broja laktobacila (log CFU/ml) nakon inkubacije od jednog sata i procenat preživljavanja u simuliranim uslovima duodenuma.

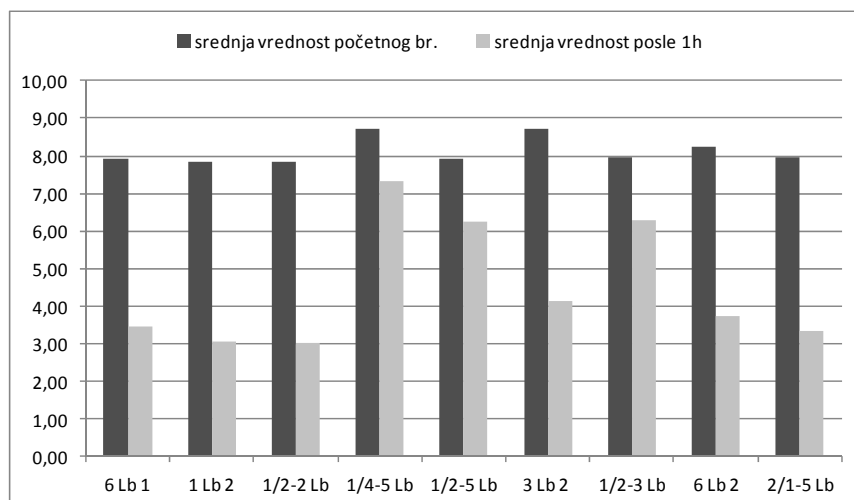
Tabela 4. Prikaz preživljavanja laktobacila posle 1h inkubacije u simuliranim uslovima duodenuma

Preživljavanje laktobacila u simuliranim uslovima duodenuma		
Statistički parametar	Početni broj log CFU/ml	Vrednost posle 1h log CFU/ml
Broj sojeva	9	9
Srednja vrednost i standardna devijacija	8,12±0,36	4,51±1,65
Minimalna vrednost	7,85	3,00
Maksimalna vrednost	8,72	7,31
Procenat preživljavanja	55,54	

Prema rezultatima dobijenim u ovom ispitivanju, procenat preživljavanja ispitivanih sojeva laktobacila u

simuliranim uslovima duodenuma iznosio je prosečno 55,54%. Promena broja log CFU/ml prikazana je na grafikonu 2.

Grafikon 2. Promena broja log CFU/ml laktobacila nakon inkubacije od 1h u simuliranim uslovima u duodenumu



Usvajajući kriterijum da se dobra sposobnost preživljavanja karakteriše procentom preživljavanja $\geq 50\%$, što je i jedan od osnovnih uslova ispoljavanja probiotkog mehanizma delovanja (Sieladie i sar., 2011), svega tri soja odgovaraju ovom kriterijumu. Iz rezultata prikazanih na grafikonu 2. može se primetiti da promene u broju log CFU/ml značajno variraju između pojedinih sojeva, a interval preživljavanja se kretao u rasponu 38,24%–83,90%. Stoga se može zaključiti da je sposobnost preživljavanja u prisustvu žuči isključivo karakteristika vezana za pojedine vrste i sojeve, što se naglašava i u podacima iz literature (Bao i sar., 2010; Morelli, 2000).

Jamaly i saradnici (2011) dokazuju rezistenciju na prisustvo žuči u koncentraciji od 0,3% kod 10, od ukupno 18 ispitivanih sojeva. U ispitivanju Prasad i sar. (1998) utvrđeno je dobro preživljavanje sojeva laktobacila pri koncentraciji od 0,4% žučnih soli, dok se značajna inhibicija rasta i time smanjenje broja laktobacila utvrđuje pri koncentracijama od 0,8%, odnosno 1% žuči. Rezultati Maurad i Meriem (2008) pokazuju da se, od 38 ispitivana soja *Lactobacillus plantarum*, 14 karakterisalo tolerancijom na 2% žuči uz procenat preživljavanja u opsegu 69%–75%. Ipak, ispitivanje tolerancije sojeva laktobacila pri koncentraciji od 2% žuči ne reflektuje stvaran broj tolerantnih sojeva sposobnih da prežive, kako se navedena koncentracija žuči smatra ekstremno visokom i može se očekivati samo tokom prvog sata digestije u duodenumu ljudi i

životinja (Gotcheva i sar., 2002). Pretpostavlja se da hidrolitička aktivnost u odnosu na žučne soli stoji u osnovi mehanizma rezistencije laktobacila na toksičnost konjugovanih žučnih soli u duodenumu, i time predstavlja važan faktor kolonizacije i opstanka populacije laktobacila u sredini duodenuma (De Smet i sar., 1995). Međutim, rezultati ispitivanja pojedinih autora pokazuju da se kod testiranih sojeva laktobacila, i pored tolerancije na žuč, ne utvrđuje hidrolitička aktivnost, i time hidroliza žučnih soli nije jedini mehanizam tolerancije na žuč (Schillinger i sar., 2005; Bertazzoni i sar., 2002).

Antimikrobna aktivnost

Značajan kriterijum pri selekciji probiotkih sojeva bakterija je i njihova mogućnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama. Bakterije mlečne kiseline tu sposobnost imaju zahvaljujući mehanizmu kompetitivnog isključenja, ali i kao posledica produkcije vodonik-peroksida, organskih kiselina, diacetila i bakteriocina (Sieladie i sar., 2011).

Za devet sojeva *Lactobacillus spp.* ispitivano je da li mogu da inhibišu rast pojedinih patogenih bakterija, gde su kao indikatori korišćeni *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 i *Staphylococcus aureus* (izolat iz kolekcije Laboratorije Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla). Rezultati su dobijeni merenjem prečnika zone inhibicije koja se nalazi oko bazenčića sa laktobacilima posle 24h inkubacije na 37°C. U tabeli 5. prikazane su dobijene vrednosti.

Tabela 5. Zone inhibicije rasta *L. monocytogenes* i *S. aureus* za devet ispitivanih sojeva

Oznaka soja	Prečnik zone inhibicije u mm	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
6 Lb 1	20	20
1 Lb 2	20	25
1/2-2 Lb	30	25
1/4-5 Lb	15	30
1/2-5 Lb	25	20
3 Lb 2	35	25
1/2-3 Lb	35	20
6 Lb 2	30	25
2/1-5 Lb	20	25

Svi sojevi *Lactobacillus spp.* pokazali su inhibitorno dejstvo na ispitivane patogene. U istraživanju koje su sprovedi Jamaly i saradnici (2011) ispitivano je antimikrobno dejstvo laktobacila na veći broj patogenih mikroorganizama: *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus D*, *Klebsiella pneumonia*. Od deset ispitivanih sojeva laktobacila, svi su pokazali inhibitorno dejstvo prema patogenima.

U istraživanju antimikrobne aktivnosti laktobacila koje su vršili Arokiyamy i Sivakumar (2011), fokus ispitivanja antimikrobne aktivnosti je bio usmeren na patogene bakterije koje se prenose uglavnom putem hrane: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* i *Shigella dysenteriae*. U ispitivanju je korišćeno pet sojeva laktobacila, a na svaki od patogena inhibitorno dejstvo je pokazalo barem dva soja. Ukoliko se prihvati kriterijum da zona inhibicije veća od 15 mm ukazuje na veoma jaku antimikrobnu aktivnost, tada

je svih devet sojeva laktobacila u ovom ispitivanju pokazalo izuzetna antimikrobna svojstva u odnosu na oba patogena. Kako u našem ispitivanju antimikrobne aktivnosti korišćeni supernatant kulture ispitivanih sojeva laktobacila nismo neutralisali, niti izložili delovanju proteinaza, uočene zone inhibicije indikator bakterija ne možemo jasno dovesti u vezu bilo sa niskom pH vrednošću, odnosno produkcijom kiseline, niti sa produkcijom bakteriocina.

Prema podacima iz literature, u jednom od istraživanja svih 15 ispitivanih sojeva laktobacila je pokazalo inhibitorno dejstvo na veliki broj testiranih patogena (*Listeria innocua* ATCC 33090, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* klinički izolat MDR, *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *E. Coli* ATCC 13706, *E. coli* klinički MDR izolat, *S. typhi* ATCC 6539, *P. aeruginosa* ATCC 20027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* klinički izolat), među kojima je bilo i više sojeva *S. aureus* (Si-

eladie i sar., 2011). U drugom istraživanju, u kome su ispitivana svega dva soja, pokazalo se da su oba inhibisala rast *L. monocytogenes* i *S. aureus* (Radulović i sar., 2008). Dostupni literaturni podaci su u potpunom skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju.

Sposobnost hemolize na krvnom agaru

Hemolitička aktivnost je praćena za devet sojeva *Lactobacillus spp.*, kako bi se proverilo postojanje moguće patogenosti ispitivanih sojeva. Rezultati su dobijeni posmatranjem da li postoji zona hemolize na krvnom agaru posle 24h inkubacije na 37 °C (slika 1).



Slika 1. γ hemoliza laktobacila koji su zasejani na krvnom agaru

Prema FAO/WHO vodiču (2002), bezbednost probiotskih sojeva je jedan od preporučenih atributa. Sa aspekta bezbednosti probiotika, nepostojanje hemolitičke aktivnosti jedan je od važnih kriterijuma, jer se dovodi u vezu sa razaranjem epitelnog sloja intestinuma, čime se otvaraju vrata infekcije. Pored toga, narušeni integritet epitela se prepoznaje kao izvor aler-

gijskih autoimunih oboljenja i time postoji rizik po zdravlje ljudi (Bengmark, 2003). U našem ispitivanju, kod sojeva laktobacila nije utvrđena hemolitička aktivnost, što se podudara sa podacima mnogih autora (Sieladie i sar., 2011; Kalui i sar., 2010; Jamaly i sar., 2011; Maurad i Meriem, 2008).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Od 51 ispitanog soja laktobacila, šest (11,76%) sojeva je bilo osetljivo na sve antibiotike, dok je na jedan od njih rezistenciju pokazalo 19 (37,25%) sojeva. Postojanje multirezistencije zapaženo je kod 26, odnosno 50,98% sojeva. Najčešći uočeni profil fenotipske rezistencije jeste rezistencija na tetraciklin.
2. Procenat preživljavanja svih devet sojeva laktobacila ispitanih na sposobnost preživljavanja u simuliranim uslovima želudačne sredine iznosio je 96,22%. U simuliranim uslovima duodenuma, tri od ukupno devet ispitanih sojeva laktobacila pokazao je procenat preživljavanja $\geq 50\%$.
3. Kod svih ispitanih sojeva laktobacila uočena je sposobnost inhibicije rasta *S. aureus* i *L. monocytogenes*.
4. Nijedan od ispitanih sojeva laktobacila nije pokazao sposobnost hemolize.

LITERATURA

1. Arokiyarny A., Sivakumar P. K., (2011): *Antibacterial activity of bacterocin producing Lactobacillus*

- spp.*, isolated from traditional milk products, Curr. Bot., 2: 5–8.
2. Bao Y., Zhang Y. C., Zhang Y., Liu Y., Wang S. Q., Dong X. M., Wang Y. Y., Zhang H. P. (2010): *Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products*, Food Control 21, 695–701.
 3. Bengmark S. (2003): *Use of pre-, pro-, and synbiotics in critically ill patients*, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 17: 833–848.
 4. Bernardeu M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Guégen M. (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus*, International Journal of Food Microbiology 126: 278–285.
 5. Bertazzoni M. E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O., Ferrario O., Hendriks H., Charalampopoulos D., Pandiella S. S., Webb C., (2002): *Evaluation of the effect of malt, wheat, and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions*, International Journal of Food Microbiology 82: 133–141.
 6. Bulajić S., Mijačević Z. (2011) *Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from Sombor cheese*, Acta Veterinaria 61: 247–258.
 7. Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salyano G., Sorrentino E., (2005): *Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese*, Lait, 85, 193–204.
 8. Danielsen M., Wind A. (2002): *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*, International Journal of Food Microbiology 82: 1–11.
 9. De Smet I., Van Hoorde L., Vande Woestyne M., Christiaens H., Verstraete W. (1995): *Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli*, Journal of Applied Bacteriology, 79: 292–301.
 10. Dunne C. L., Mahony M., Thornton G., Morrissey D., Hallorans S., Feeney M., Flynn S., Kiely B., Daly C., Collins K. (2001): *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings*, American Journal of Clinical Nutrition, 73: 386–392.
 11. EFSA (2008): *Technical guidance: Update of the criteria used in assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance*, The EFSA Journal 732: 1–15.
 12. FAO/WHO Working group report, (2002): *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, London, Ontario, Canada
 13. Frece J., Kos B., Svetec I. K., Zgaga Z., Beganović J., Leboš A., Šušković J. (2009): *Synbiotic effect of Lactobacillus helveticus M92 and prebiotics on the intestinal microflora*

- and immune system of mice*, J. Dairy Res 76: 98–104.
14. Gotcheva V., Hristozova E., Hristozova T., Guo M., Roshkova Z., Angelov A. (2002): *Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains*, Food Biotechnology 16: 211–225.
15. Jamaly N., Benjouad A., Bouksaim M. (2011): *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products*, British Microbiology Research Journal 1: 79–94.
16. Kaktcham P. M., Zambou N. F., Tchouanguép F. M., El-Soda M., Choudhary M. I. (2011): *Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods*, Sci Pharm 80: 189–203.
17. Kalui C. M., Mathara J. M., Kutima P. M. (2010): *Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – a review*, African Journal of Biotechnology 9: 17, 2490–2498.
18. Kos B., Šušković J., Beganović J., Gjuračić K., Frece J., Iannaccone C., Canganella F. (2008): *Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry*, World J. Microbiol. Biotechnol 24: 699–707.
19. Mathara J. M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P. M., Mbugua S. K., Shin H. K., Holzapfel W. H. (2008): *Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya*, International Journal of Food Microbiology 126, 57–64.
20. Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Fondén R., Saarela M. (2002): *Technological challenges for future probiotic foods*, International Dairy Journal, 12: 173–182.
21. Maurad K., Meriem K. H. (2008): *Probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria*, Grasas Y Aceites 59: 3, 218–224.
22. Millette M., Liquet F. M., Ruiz M. T., Lacroix M. (2008): *Characterization of probiotic properties of Lactobacillus strains*, Dairy Sci. Technol 88: 695–705.
23. Morelli L. (2000): *In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal*, Curr. Issues Intest. Microbiol 1: 59–67.
24. Morelli L. (2007): *In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality*, International Dairy Journal 17: 1278–1283.
25. Nawaz M., Wang J., Zhou A., Ma C., Wu X., Xu J. (2011): *Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan*, African Journal of Microbiology Research 512: 1428–1436.

26. Prasad J., Gill H., Smart J., Gopal K. P. (1998): *Selection and characterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use in probiotics*, Int. Dairy Journal, 8: 993–1002.
27. Radulović Z., Petrović T., Paunović D., Mirković N., Obradović D. (2008): *Karakterizacija autohtonog soja Lactobacillus paracasei na potencijalne probiotske sposobnosti*, Prehrambena industrija, 19: 23–28.
28. Salminen M. K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Jarvinen A. (2006): *Lactobacillus bacteriaemia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates*, Clinical infectious diseases 42: 35–44.
29. Saulnier D. M. A., Spinler J. K., Gibson G. R., Versalovic J. (2009): *Mechanism of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods*, Curr. Opin. Biotechnol. 20: 135–141.
30. Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W. H. (2005): *In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt like products*, Int. Dairy J 15: 1289–1297.
31. Shah N. P. (2006): *Functional cultures and health benefits*, In: *Scientific and technological challenges in fermented milk*, 2nd IDF dairy science and technology week, Book of abstracts, Sirmione, Italy, 35–36.
32. Sieladie D. V., Zambou N. F., Kaktcham P. M., Cresci A., Fonteh F. (2011): *Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon*, Inovative Romanian Food Biotechnology 9: 12–28.
33. Šušković J., Kos B., Goreta J., Matošić S. (2001): *Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect*, Food Technol. Biotechnol 39: 227–235.
34. Tagg J. R., McGiven A. R., (1971): *Assay system for bacteriocins*, Appl. Environ. Microbiol 21: 5, 943.
35. Vasiljevic T., Shah N. P. (2008): *Probiotics – From Metchnikoff to bioactives*, International Dairy Journal 18: 714–728.
36. Vlková E., Rada V., Popelářová P., Rojanová I., Killer J. (2006): *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves*, Livest Sci 105: 253–259.
37. WGO practice guidelines: *Probiotics and prebiotics*, (2009): Arab Journal of Gastroenterology 10: 33–42.